

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mia Knobloch

Izolacija DNA iz bioloških tragova

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2015.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mia Knobloch

Izolacija DNA iz bioloških tragova

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Milovana Kubata i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014./2015.

Mentor: prof. dr. sc. Milovan Kubat

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Nukleinska kiselina	2
3. Izolacija DNA	3
3.1. Izvor DNA uzoraka	3
3.2. Prikupljanje, očuvanje, pohrana i transport DNA uzoraka.....	4
3.3. Izolacija DNA.....	5
3.3.1. Organska izolacija DNA	6
3.3.2. Chelex metoda izolacije DNA	7
3.3.3. „FTA™ paper“ izolacija	8
3.3.4. QIAgen.....	8
3.3.5. InstaGene	13
3.3.6. FUJI Kurabo – QuickGene	14
3.4. DNA kvantifikacija.....	16
3.4.1. Real-time PCR	16
4. Lančana reakcija polimeraze	17
5. Metode razdvajanja DNA.....	21
5.1. Gel elektroforeza	21
5.2. Kapilarna elektroforeza	22
5.3. ABI Prism 310 Genetic Analyzer	23
6. Zaključak	24
7. Zahvale	25
8. Popis literature.....	26
9. Životopis.....	27

SAŽETAK

IZOLACIJA DNA IZ BIOLOŠKIH TRAGOVA

Mia Knobloch

1953. godine Watson i Crick otkrili su strukturu DNA, a ubrzo potom su drugi znanstvenici otkrili da je DNA jedinstvena za svako živo biće. Zahvaljući tome DNA se može na primjer koristiti za razlikovanje uzoraka s mjesta zločina.

Uzorci mogu biti različiti, ali najčešće korišteni su krv, slina, sjemenja tekućina, kosti, dlake. Oni moraju biti pažljivo prikupljeni da ne bi došlo do kontaminacije te transportirani u laboratorij kako bi dobiveni rezultati bili valjani dokaz na sudu.

Četiri najčešće korištene metode izolacije u DNA laboratoriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu su organska izolacija, InstaGeneTM Matrix (Biomax), QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) i FUJI poluautomatizirana jedinica za izolaciju DNA. Izolirana DNA se potom pohranjuje na -20 ili -80°C. Idući korak je kvantifikacija DNA, postupak kojim se određuje kvaliteta i kvantiteta DNA iz uzorka. Potom slijedi PCR, metoda in vitro amplifikacije fragmenata DNA. Rezultat toga je mješavina amplikona koji se moraju razdvojiti kapilarnom elektroforezom ili gel elektroforezom. Na kraju postupka imamo veliki broj istih DNA fragmenata koji se mogu koristiti u istrazi.

Ključne riječi: DNA izolacija, biološki tragovi, PCR, elektroforeza

SUMMARY

DNA ISOLATION FROM BIOLOGICAL STAINS

Mia Knobloch

In 1953 Watson and Crick discovered the structure of DNA molecule and soon after that scientists discovered it is unique for every living creature. Because of that it can be for example used to distinguish samples on crime scenes.

Samples can be various but most commonly used are blood, saliva, semen, bones, hair. Samples must be collected carefully without contamination and transported to a laboratory so the results could be valid at the court.

Four most common isolation methods in DNA laboratory at School of Medicine, University of Zagreb are organic isolation, InstaGeneTM Matrix (Biomax), QIAamp DNA Mini kit (QIAgen) i FUJI semi-automated unit for DNA extraction. Isolated DNA is then stored at -20°C or -80°C. The next step is the DNA quantification, the procedure to determine quality and quantity of the DNA from the sample, after which it is possible to do the PCR, the method of in vitro amplification of DNA fragments. The result is a mix of amplicons which needs to be separated by capillary electrophoresis or gel electrophoresis. In the end, we have a big number of the same DNA fragments which can be used in an investigation.

Key words: DNA isolation, biological stains, PCR, electrophoresis

1. Uvod

Otkrićem DNA, jedinstvenog genetskog materijala svakog bića, uvelike se olakšao posao kriminalističkim istražiteljima. Potrebno je samo pronaći biološki uzorak na mjestu zločina, adekvatno ga uzeti i prenijeti u laboratorij gdje se onda postupcima izolacije DNA izolira i uspoređuje s mogućim počiniteljima.

Cilj ovog diplomskog rada je izložiti metode izolacije DNA iz bioloških tragova koje se danas najčešće koriste, ali i one koje su već zastarijele no bile su važna preteča današnjih metoda te opisati postupke kvatifikacije DNA, umnažanja DNA putem lančane reakcije polimeraze i analizu DNA metodama razdvajanja DNA.

2. Nukleinska kiselina

Nukleinska kiselina je velika molekula ključna za sve oblike života čija je osnovna građevna jedinica monomer nukleotid. Svaka molekula nukleotida sastavljena je od dušične baze, molekule šećera i molekule fosfata. Dušične baze dijele se na purinske, koje uključuju adenin i gvanin te pirimidinske, koje uključuju timin, citozin i uracil. S obzirom na vrstu šećera u nukleotidu, nukleinska kiselina će biti DNA (deoksiribonukleinska kiselina), ako sadrži šećer deoksiribozu, odnosno RNA (ribonukleinska kiselina), ako sadrži šećer ribozu. Dušične baze adenin, gvanin i citozin nalaze se u obje nukleinske kiseline, dok se timin nalazi isključivo u DNA, a uracil u RNA.

Model strukture DNA predložili su 1953. godine Watson i Crick, za što su, zajedno s Maurice Wilkinsonom, dobili Nobelovu nagradu za medicinu i fiziologiju 1962. godine. Njihov prijedlog je bio, što se pokazalo i ispravnim, da je DNA dvostruka uzvojnica, građena od dva antiparalelna nukleotidna lanca. Okosnicu svakog nukleotidnog lanca čine fosfodiesterske veze između ugljika na 3' i 5' mjestu susjednih šećera, a lanci su međusobno povezani vodikovim vezama između dušičnih baza. I to se adenin povezuje s timinom dvostrukom vodikovom vezom, a gvanin s citozinom trostrukom vodikovom vezom. Svaki nukleotidni lanac ima i svoju polarnost koja je određena orijentacijom šećera i fosfata. Lanac koji završava s 5' ugljikovim atomom na molekuli šećera označava se kao 5' kraj, dok se lanac koji završava s 3' ugljikovim atomom naziva 3' kraj. U molekuli DNA 5' kraj uvijek se nalazi nasuprot 3' kraju te se iz tog razloga kaže da su nukleotidni lanci antiparalelni (Turnpenny, Ellard, 2011.).

3. Izolacija DNA

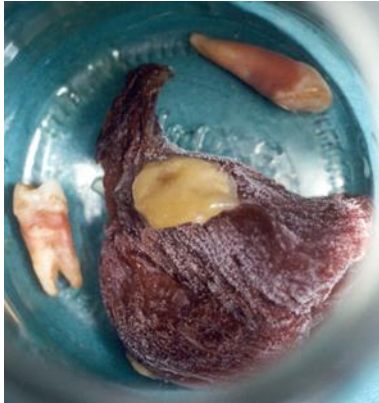
3.1. Izvor DNA uzoraka

Prije nego je moguće napraviti DNA test, DNA se mora izolirati iz bioloških uzoraka i prilagoditi daljnjoj analizi. DNA se nalazi u svakoj stanici sa jezgrom i uspješno se može izolirati iz brojnih bioloških materijala pa tako i onih ostavljenih na mjestu zločina. Forenzički laboratorij osim što obrađuje uzorke kriminalističkih slučajeva, bavi se i utvrđivanjem očinstva/srodstva te identifikacijom nestalih osoba, npr. u ratu, nesrećama, masovnim katastrofama. Najčešći uzorci korišteni u forenzičkim laboratorijima su krv i ejakulat te kosti, zubi, kosa s korijenom, dlaka, slina, urin, feces, krhotine noktiju, mišićno tkivo, opušak, prhut, otisci prstiju (tablica 1). Kako su ti uzorci najčešće količinski mali, veliku ulogu ima PCR koji omogućuje stvaranje kopija DNA (Butler, 2001.).

Prije obrade u kriminalističkom DNA laboratoriju, uzorci s mjesta zločina koji sadrže DNA moraju biti pažljivo prikupljeni, očuvani, pohranjeni i transportirani, kako bi dobiveni rezultati bili valjani dokaz na sudu (Butler, 2001.).

UZORAK	REFERENCA
sperma i mrlje od sperme	Budowle et al. (1995)
kosti	Gill et al. (1994)
zubi	Alvarez Garcia et al. (1996)
kosa s korijenom	Higuchi et al. (1988)
dlaka	Wilson et al. (1995)
slina	Sweet et al. (1997)
urin	Benecke et al (1996)
feces	Hopwood et al. (1996)
krhotine noktiju	Wiegand et al. (1993)
mišićno tkivo	Hochmeister (1998)
opušak	Hochmeister et al. (1991)
poštanski batrljci	Hopkins et al. (1994)
prhut	Herber and Herold (1988)
otisci prstiju	Van Oorschot and Jones (1997)
britvica, žvakača guma, cerumen, četkica za zube	Tahir et al. (1996)

Tablica 1. Biološki materijali korišteni za DNA tipizaciju (Butler, 2001.)



Slika 1. Uzorak bioloških tragova (zubi, mišić)



Slika 2. Uzorak bioloških tragova (kost)

3.2. Prikupljanje, očuvanje, pohrana i transport DNA uzoraka

Ne može se dovoljno naglasiti koliko je bitno pravilno prikupiti uzorke s mjesta zločina. Ako se uzorak kontaminira već prilikom prikupljanja, neće biti moguće provesti pravilnu analizu i rješavanje cijelog slučaja je ugroženo. Iz tog razloga postoje smjernice kojih se treba držati prilikom prikupljanja uzoraka.

- U području gdje su mogući DNA uzorci ništa se ne smije dirati bez rukavica, ne smije se kihati niti kašljati.
- Svaki uzorak se mora prikupiti s novim, čistim rukavicama.
- Svaki uzorak se mora staviti u posebnu vrećicu.
- Tragovi krvi i ejakulata moraju se posušiti na zraku prije nego što se zatvore u vrećicu za uzorke.
- Trebaju se koristiti papirnate vrećice jer u plastičnima dolazi do kondenzacije vode, a voda ubrzava degradaciju DNA. Na svakoj vrećici se mora napisati broj slučaja, broj uzorka i datum prikupljanja.

- Tragovi koji se nalaze, npr. na podu, zidu, mogu se prikupiti štapićem s vatom i destiliranom vodom. Vlažnom vatom trlja se uzorak dok se ne prenese na vatu, zatim se vata ostavi na zraku da se osuši te se spremi u papirnatu kuvertu.

Većina bioloških uzoraka se najbolje očuva ukoliko su pohranjeni suhi i hladni jer u ovim uvjetima rast bakterija je smanjen i smanjeno je propadanje DNA. Uzorci se trebaju što prije odnijeti u laboratorij gdje se pohranjuju u hladnjaku na 4°C ili ledenici na -20°C (Butler, 2001.).

3.3. Izolacija DNA

U svim biološkim uzorcima uz molekulu DNA se nalaze i brojne druge molekule, npr. stanični proteini koji štite DNA i time onemogućuju analizu DNA. Zbog toga su se razvile metode izolacije DNA pomoću kojih se DNA odvaja od ostalih staničnih dijelova. Tri glavne, najčešće korištene metode izolacije DNA prije desetak godina su bile organska izolacija, Chelex izolacija i FTA papir izolacija. U DNA laboratoriju Medicinskog fakulteta u Zagrebu danas se organska izolacija još uvijek koristi no pretežno su u upotrebi InstaGeneTM Matrix (Biomax), QIAamp DNA Mini kit (QIAgen) i FUJI poluautomatizirana jedinica za izolaciju DNA. Neovisno o metodi koja se koristi postupak se mora provoditi vrlo pažljivo jer je mogućnost kontaminacije uzorka u laboratoriju veća nego u bilo kojem od prethodno navedenih koraka prikupljanja, pohranjivanja te se iz tog razloga često u laboratorijima obrađuje jedan po jedan uzorak.

Izolirana DNA obično se pohranjuje na -20°C ili na -80°C, ako se radi o dugotrajnoj pohrani kako bi se spriječila aktivnost enzima endonukleaze koji degradira DNA. Kako bi endonukleaze mogle katalizirati reakciju uništenja DNA potreban im je magnezij. Iz tog

razloga, radi stroge prevencije njihovog djelovanja pri pohrani molekule DNA preporučeno je koristiti epruvete ljubičastog poklopca koje sadrže EDTA (Butler, 2001.).

3.3.1. Organska izolacija DNA

Organska izolacija ili fenol-kloroform izolacija je metoda koja je najduže u upotrebi. Ovim postupkom dobivaju se veliki fragmenti izolirane DNA i čišći nego nakon drugih metoda izolacije. Nedostaci ove metode su dugotrajnost, korištenje opasnih kemikalija i uzorci se više puta moraju prenositi iz epruvete u epruvetu čime se povećava rizik pogreške i kontaminacije (Butler, 2001.).

Izolacija DNA metodom organske izolacije iz kosti:

1. Kost duljine cca 10 cm očistiti dremelom, po mogućnosti, do zdravog sloja.
2. Oprati kost pod tekućom vodom, destiliranom vodom, apsolutnim etanolom i osušiti.
3. U sterilnu epruvetu usitniti 3 do 5 g kosti.
4. Dodati 40 mL 0,5 M EDTA, pH 7.5 i mućkati 24 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga centrifugirati 5 minuta na 5000 g. Korak 4. ponoviti 2 puta.
5. Talog isprati sa 40 mL destilirane vode i centrifugirati 15 minuta na 2000 g. Korak 5. ponoviti 2 puta.
6. Na talog dodati 3 mL pufera za ekstrakciju i 500 µL proteinaze K (20 mg/ mL). Mućkati 48 sati na 56 °C.
7. Phase Lock Gel (PLG) (Eppendorf) epruvetu centrifugirati 2 minute na 10000 g da se gel spusti.
8. Izuzeti 3 mL ekstrakta i staviti u PLG epruvetu te dodati 3 mL fenol-kloroform-izoamil alkohol (PCI) otopine, pH 8.0. Centrifugirati 5 minuta na 5000 g.

9. Prebaciti vodenu fazu (gornju) u novu epruvetu i dodati 3 mL PCI otopine. Centrifugirati 2 minute na 5000 g. Ponoviti korak 9.
 10. Prebaciti vodenu fazu u novu epruvetu i dodati 3 mL n-butanola. Centrifugirati 2 minute na 5000 g.
 11. Vodenu (donju) fazu prebaciti u centrikon-100 i centrifugirati 45 minuta na 2600 g.
 12. Dodati 2 mL Tris pufera i centrifugirati 30 minuta na 2600 g. Ponoviti korak 11.
 13. Spustiti uzorak u kapicu centrikona centrifugirajući 2 minute na 2600 g.
 14. Prebaciti uzorak u ependorf epruvetu.
- (Zavod za sudsku medicinu i kriminalistiku u Zagrebu, DNA laboratorij, 2012.)

3.3.2. Chelex metoda izolacije DNA

Chelex metoda, Chelex[®]100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) , uvedena je 1991. godine. Chelex[®]100 je ion izmjenjujuća smola koja se dodaje kao suspenzija na uzorak (Walsh et al., 1991.). Chelex se sastoji od stiren-divinilbenzenskih polimera koji sadrže parne iminodiacetatne ione. Ti ioni imaju ulogu kelatnih grupa u vezanju polivalentnih iona, npr. magnezija. Nakon što se iz reakcije makne magnezij, inaktiviraju se i endonukleaze pa molekula DNA biva zaštićena.

Prednost ove metode pred organskom izolacijom je brzina te manje koraka u postupku čime je mogućnost kontaminacije smanjena. Nedostatak je to što se dobije jednostruka DNA, znači da se kasnije za umnožavanje može se koristiti samo PCR (Butler, 2001.).

Ako se u suspenziju Chelex doda previše uzorka može doći do inhibicije PCR. Preporučena količina krvi je 3μL, a krvnog traga cca. 3x3mm (Perkin Elmer Corporation, 1998.).

3.3.3. „FTATM paper“ izolacija

FTATM papir otkrio je krajem 1980.-ih Lee Burgoyne kao metodu pohrane DNA (Burgoyne et al. 1994.). FTATM papir je apsorbirajući celulozni papir koji sadrži četiri vrste kemikalija koje čuvaju DNA od degradacije i sprječavaju rast bakterija na papiru (Burgoyne, 1996.). Na sobnoj temperaturi DNA ostaje nepromijenjena nekoliko godina.

- Uzorak krvi kapne se na FTA papir i ostavi da se osuši. Stanice se razgrađuju, a molekula DNA ostaje imobilizirana unutar matrice papira.
- Komadić papira s uzorkom krvi se odreže i stavi u epruvetu i izloži procesu pranja u kojem se DNA očisti od hema i ostalih mogućih inhibitora PCR reakcije.
- Proces čišćenja je jasno vidljiv jer papir koji je bio crven od krvi gubi crvenu boju.
- Papir koji sadrži čistu DNA se podvrgava PCR reakciji.

(Lorente et al., 1998.)

Velika prednost ove metode izolacije DNA je to što nije potrebno provoditi kvantifikaciju kako bi se dobili pouzdani rezultati. Također, ako je potrebno provoditi više analiza na jednom uzorku ne treba raditi novu izolaciju već se koristi postojeći papir s DNA.

Osim za uzorke krvi, ova metoda dobra je i za uzorke stanica bukalne sluznice (Burgoyne, 1997.). Jednokratnom četkicom uzme se uzorak stanica i prenese na FTA papir za pohranu i čuvanje.

3.3.4. QIAgen

QIAquick Gel Extraction Kit omogućuje izolaciju 80% čiste DNA, tako da odstrani nukleotide, enzime, soli, etidij bromid i druge nečistoće iz uzorka. Korištenjem mikrocentrifuge ili vakuumske cijevi izolira se DNA veličine 70bp do 10kb. Za izolaciju manjih ili većih fragmenata treba se koristiti QIAEX II Gel Extraction System.

QIAquick Kit sadrži silikonsku membranu koja odvaja primere, nukleotide, enzime, mineralna ulja, sol, agarozu, etidij bromid i ostale nečistoće od DNA.

QIAquick sistem koristi jednostavan postupak vezivanja i otpuštanja s membrane. Komadići gela se otope u puferu koji sadrži pH indikator, time se vidi optimalni pH za vezanje DNA te se mješavina primjeni na QIAquick spin kolonu. Pufer stvori acidozne uvjete u kojima se DNA veže na silikonsku membranu. Nečistoće se speru, a čista DNA se ispere otopinom slabo kiselog pufera ili vodom.

QIAquick spin kolone dizajnirane su za jednostavno rukovanje, tako da pristaju u različite modele centrifuga.

Izolirana DNA spremna je za direktno korištenje kod različitih upotreba, npr. sekvenciranje, ligacija i transformacija, označavanje, mikroinjekcija, PCR, in vitro transkripcija.

(<https://www.qiagen.com/hr/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/dna-cleanup/qiaquick-gel-extraction-kit/#productdetails>)

Izolacija DNA metodom QIA amp DNA Mini Kit iz tkiva:

1. Staviti uzorak u ependorf epruvetu s navojem i dodati 180 μ L ATL pufera.
2. Dodati 20 μ L proteinazu K, vorteksirati i inkubirati na 56°C dok se ne otopi, a zatim kratko centrifugirati.
3. Dodati 200 μ L AL pufera, vorteksirati i inkubirati na 70°C 10 minuta pri čemu mora nastati homogena smjesa.
4. Dodati 200 μ L apsolutnog etanola, vorteksirati i kratko centrifugirati.
5. Nanijeti uzorak na kolonu. Zatvoriti kolonu i centrifugirati 1 minutu na 8000 g, a zatim prenijeti u novu kolekcijsku tubicu.
6. Dodati 500 μ L AW1. Zatvoriti kolonu i centrifugirati 1 minutu na 8000 g te prenijeti u novu kolekcijsku tubicu.

7. Dodati 500 µL AW2, centrifugirati 3 minute na 14000 g.
8. Staviti kolonu u ependorf epruvetu od 1,5 mL i dodati 50 µL vode. Inkubirati 1 minutu na RT pa centrifugirati 1 minutu na 8000 g.

(Zavod za sudsku medicinu i kriminalistiku u Zagrebu, DNA laboratorij, 2012.)

Izolacija DNA metodom QIA amp DNA Mini Kit iz sline:

1. Staviti uzorak u ependorf epruvetu s navojem i dodati 180 µL ATL pufera.
2. Dodati 20 µL proteinaze K, vorteksirati i inkubirati 1 sat na 56°C, a zatim kratko centrifugirati.
3. Dodati 200 µL AL pufera, vorteksirati i inkubirati 10 minuta na 70°C pri čemu mora nastati homogena smjesa.
4. Dodati 200 µL apsolutnog etanola, a zatim vorteksirati.
5. Nanijeti uzorak na kolonu. Zatvoriti kolonu i centrifugirati 1 minutu na 8000 g. Prenijeti u novu kolekcijsku tubicu.
6. Dodati 500 µL AW1. Zatvoriti kolonu i centrifugirati 1 minutu na 8000 g. Prenijeti u novu kolekcijsku tubicu.
7. Dodati 500 µL AW2, centrifugirati 3 minute na 14 000 g.
8. Staviti kolonu u ependorficu od 1,5 mL i dodati 100 µL vode. Inkubirati 1 minutu na sobnoj temperaturi pa centrifugirati 1 minutu na 8000 g.

(Zavod za sudsku medicinu i kriminalistiku u Zagrebu, DNA laboratorij, 2012.)

Izolacija DNA metodom QIA amp DNA Mini Kit iz dlake:

1. Po potrebi oprati dlaku ksilolom, apsolutnim etanolom i destiliranom vodom.
2. Dodati 200 μ L pufera za ekstrakciju, 5 μ L proteinaze K (20 mg/ μ L) i 8 μ L 1M DTT.
Inkubirati na 56°C preko noći.
3. Ako se dlaka nije rastopila dodati još proteinaze K.
4. Dodati 200 μ L fenol-kloroform-izoamil alkohol (PCI) otopine, pH 8. Centrifugirati 2 minute na 15000 g.
5. Prebaciti vodenu fazu (gornju) u novu epruvetu i dodati 200 μ L PCI otopine.
Centrifugirati 2 minute na 15000 g. Ponoviti peti korak sve dok ne bude jasna granica među fazama.
6. Prebaciti vodenu fazu u novu epruvetu i dodati 200 μ L n-butanola. Centrifugirati 2 minute na 15000 g.
7. U centrikon-100 dodati 1,5 mL Tris pufera.
8. Vodenu (donju) fazu prebaciti u centrikon-100 i centrifugirati 15-30 minuta na 2600 g, odnosno dok sva tekućina ne prođe te baciti filtrat.
9. Dodati 2 mL Tris pufera i centrifugirati 15-30 minuta na 2600 g.
10. Spustiti uzorak u kapicu centrikona centrifugirajući 2 minute na 2600 g.
11. Prebaciti uzorak u čistu ependorf epruvetu.

(Zavod za sudsku medicinu i kriminalistiku u Zagrebu, DNA laboratorij, 2012.)

Izolacija DNA metodom QIA amp DNA Mini Kit iz kosti:

Da bi se kost mogla iskoristiti za dobivanje DNA ona se prvo mora očistiti. Površina kosti očisti se dremelom, a dodatnih 2-3 milimetara kosti se odstrani za slučaj prisutnosti drugih kontaminanata. Ostatak kosti stavi se u falkonicu od 50 mL te se ispere sa 30 mL vode, 30 mL 10% bleach-a (0,5% Na-hipoklorit) i 30 mL 96% alkohola. Kost se suši 2 sata na 50°C. Tako

očišćenu kost dremla se u hoodu. Za izolaciju DNA koristi se 2 g koštanog praha koji se deklacificira sa 0,5 M EDTA 3-5 dana.

1. Na prah dodati 2 mL ATL ekstrakcijskog pufera i 100 μ L proteinaze K (20mg/ μ L) te inkubirati 18-24 sati na 56°C.
2. Dodati 1650 μ L AL pufera, dobro izvorteksirati i inkubirati 1 sat na 70°C.
3. Centrifugirati 5 minuta na 5000 g i supernatant prenijeti u čistu falkonicu od 15 mL.
4. Dodati 1V 96% etanola i dobro promiješati.
5. 700 μ L ekstrakcijske smjese dodati na kolonu i centrifugirati 3 minute na 3000 g. Eluat baciti, a postupak ponavljati dok sve ne prođe kroz kolonu.
6. Kolone s vezanom DNA isprati sa 700 μ L AW1 pufera, centrifugirati 5 minuta na 3000 g i baciti eluat.
7. Kolone isprati sa 700 μ L AW2 pufera, centrifugirati 15 minuta na 3000 g i baciti eluat.
8. Uzeti novu kolekcijску tubu. Eluirati DNA dodatkom 300 μ L AE pufera prethodno zagrijanog na 70°C. Inkubirati 5 minuta na 70°C, a zatim centrifugirati 3 minute na 3000 g. Eluat ne baciti!
9. Dodati 300 μ L AE pufera. Inkubirati na sobnoj temperaturi 5 minuta, a zatim centrifugirati 10 minuta na 3000 g.
10. Kompletni eluat od 600 μ L staviti u centrikon 100 i centrifugirati 5-7 minuta na 4883 g do konačnog volumena od 50-ak μ L.
11. Po potrebi isprati sa 600 μ L destilirane vode i centrifugirati 10 minuta na 3000 g.
12. Za PCR koristiti 8 μ L izolata.

(Zavod za sudsku medicinu i kriminalistiku u Zagrebu, DNA laboratorij, 2012.)

3.3.5. InstaGene

InstaGene matriks omogućuje jednostavnu i brzu izolaciju DNA koja se može koristiti za PCR. Ova metoda ne koristi fenol-kloroform jer do lize stanice dolazi već samim kuhanjem biološkog uzorka i InstaGene matriksa. InstaGene matriks apsorbira produkte lize stanica koji bi mogli smetati amplifikaciji DNA tijekom PCR (BIO RAD InstaGene™ Matrix).

Izolacija DNA pomoću InstaGene matriksa iz smrznute, ohlađene ili svježe krvi:

1. U tubicu volumena 1,5 mL dodati 3-6 µL krvi i 1 mL destilirane vode. Promiješati sadržaj tako da se tubicu okrene nekoliko puta.
2. Tubica se ostavi na sobnoj temperaturi 15-30 minuta.
3. Centrifugirati 2-3 minute na 10 000-20 000 g.
4. Pažljivo odvojiti 20-30 µL supernatanta tako da se ne uzburka InstaGen smola.
5. Dodati 200 µL InstaGene matriksa u InstaGen smolu i inkubirati 15-30 minuta na 56°C.

InstaGene matriks se treba miješati na umjerenoj brzini na magnetskom vorteksu kako bi matriks ostao u suspenziji. Nastavak za pipetu trebao bi imati veliki otvor, kao nastavci za pipetu od 1000 µL.

6. Staviti tubicu na vorteks najveće brzine 10 sekundi, a zatim kuhati 8 minuta na 100°C.
7. Staviti tubicu na vorteks najveće brzine 10 sekundi. Zatim centrifugirati 2-3 minute na 10 000-20 000 g.
8. Koristiti 20 µL gotovog supernatanta na 50 µL PCR reakcije. Ostatak supernatanta se pohrani na -20°C. Prije ponovne upotrebe pohranjenog supernatanta mora se ponoviti korak 7.

(BIO RAD InstaGene™ Matrix)

Izolacija DNA pomoću InstaGene matriksa iz krvne mrlje:

1. Izrezati uzorak i dodati 1 mL vode.
2. Inkubirati 1 sat na RT, a za vrijeme inkubacije 2-3 puta vorteksirati.
3. Centrifugirati 3 minute na 13 000 g.
4. Odpipetirati 960 µL supernatanta.
5. Dodati 200 µL InstaGen matriksa.
6. Inkubirati preko noći na 56°C.
7. Izvorteksirati i kuhati 8 minuta na 100°C.
8. Izvorteksirati pa centrifugirati 3 minute na 13 000 g.

(Zavod za sudsku medicinu i kriminalistiku u Zagrebu, DNA laboratorij, 2012.)

3.3.6. FUJI Kurabo – QuickGene

QuickGene noviji je japanski uređaj za izolaciju DNA. Uspješno izolira genomsku DNA visokom kvantitetom, a zahvaljujući specifičnoj membrani eliminira većinu kontaminanata. Također koristi i posebnu filtracijsku tehnologiju, koja se ne može postići običnom staklenom membranom, tako da je moguće izvesti brzu i kvalitetnu izolaciju DNA. Pozitivna strana je što se za izolaciju ne koriste opasni spojevi fenol i kloroform. Istovremeno se može izolirati DNA iz 8 različitih uzoraka i to u za 9-13 minuta ovisno o vrsti uređaja. Rezultat izolacije je pročišćena i visoko kvalitetna DNA koja se može koristiti za PCR, Southern blot itd.

Izolacija DNA pomoću QuickGene uređaja iz svježeg ili smrznutog tkiva:

- Priprema tkiva za lizu
 1. U mikrotubicu od 2 mL staviti 5 mg tkiva isjeckanog na male komadiće, 180 µL MDT (ekstrakcijski pufer) i 20 µL EDT (proteinaza K).
 2. Inkubirati u rotirajućem uređaju na 55°C nekoliko sati do potpunog raspada tkiva.

3. Centrifugirati 3 minute na 10 000 g pri sobnoj temperaturi.
4. Prenijeti supernatant u novu 1,5 mL mikrotubicu.
5. RNA će se izolirati zajedno s genomskom DNA. Ako to nije problem, nastavlja se sa šestim korakom, ukoliko se želi dobiti čista genomaska DNA mora se napraviti RNaza postupak:
 - Dodati 20 μ L RNaze A
 - Vorteksirati 5 sekundi te kratko centrifugirati
 - Inkubirati 2 min na sobnoj temperaturi
6. Dodati 180 μ L LDT i vorteksirati na najvećoj brzini 15 sekundi te kratko centrifugirati.
7. Inkubirati 10 minuta na 70°C te kratko centrifugirati.
8. Dodati 240 μ L 99% etanola, vorteksirati na najvećoj brzini 15 sekundi te kratko centrifugirati.

Nakon završetka lize tkiva izolacija DNA se mora provesti unutra 30 minuta, a postupak ovisi o uređaju koji se koristi, QG-810/QG-800 ili QG-Mini80.

- Protokol izolacije u uređaju QG-810/QG-800
 1. Prebaciti cijeli lizat u kazete i kazete staviti u uređaj.
 2. Odabrati odgovarajući postupak na uređaju ovisno o kitu koji se koristio.

(KURABO QuickGene DNA tissue kit S)

3.4. DNA kvantifikacija

DNA kvantifikacija postupak je određivanja količine i kvalitete izolirane DNA iz uzorka. Kvantifikacija se obavezno mora provesti prije umnožavanja DNA PCR-om jer je za PCR optimalan uski raspon količine DNA. Previše DNA ću uzrokovat peak-ove koji su izvan mjerne skale, a premalo DNA će uzrokovati ispadanje iz mjerne skale jer se neće moći umnožiti ti aleli. Ovaj se fenomen ponekad naziva stohastička fluktuacija (Butler, 2001.).

3.4.1. Real-time PCR

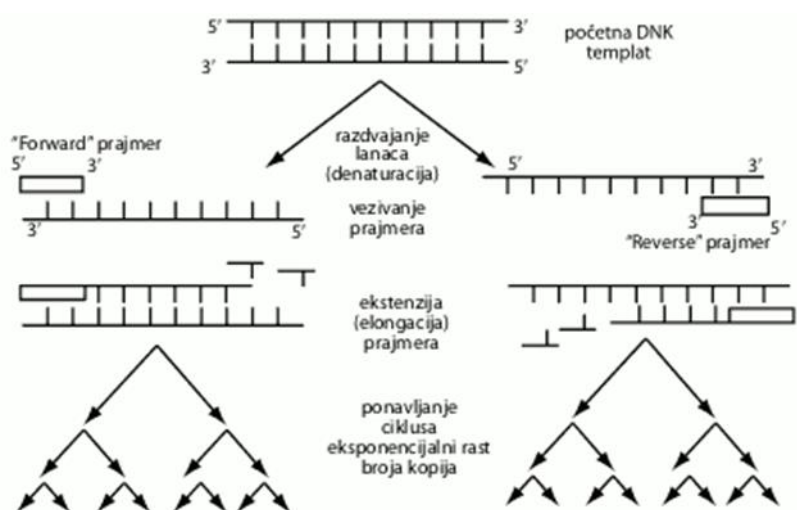
Real-time PCR jedna je od najčešće korištenih metoda kvantifikacije gena zbog svoje osjetljivosti i visoke specifičnosti. Ovo je tehnika kojom se podaci prikupljaju tijekom samog PCR procesa, znači u jednom koraku se obavlja i amplifikacija i detekcija. To je moguće upotrebom raznih fluorescentnih boja te se na temelju jačine intenziteta boja zaključuje o koncentraciji produkata PCR-a. Jedini nedostatak je skupa oprema i reagensi (Wong, Medrano, 2005.).

4. Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) je metoda eksponencijalnog in vitro umnažanja fragmenata molekule DNA. Prvi put su je opisali Kary Mullis i članovi Human Genetics group 1985. godine. Otkriće je uvelike doprinjelo razvoju molekularne biologije, medicine pa tako i forenzike. Zahvaljujući PCR-u mogu se dobiti milijuni kopija točno određene sekvence DNA za svega nekoliko sati. Zbog svog doprinosa znanosti Kary Mullis dobio je Nobelovu nagradu za kemiju 1993. godine (Sinčić, 2013.).

S vremenom, napretkom tehnologije, razvijeni su složeni protokoli umnažanja fragmenata DNA, ali osnovni princip PCRa ostaje gotovo nepromijenjen.

Za izvođenje PCRa potrebna je izolirana DNA i niz reagensa koje nazivamo PCR mješavina (engl. PCR master mix) (Sinčić, 2013.).



Slika 3. Proces amplifikacije DNK PCR metodom (Zgonjanin – Bosić, 2009.)

Sastav PCR reakcijske mješavine

- DNA matrica je izolirana DNA, odnosno dvolančana DNA koja sadrži fragment od interesa. Ona nam služi kao kalup po kojoj se provodi umnažanje i stvaranje amplikona. Neovisno o duljini DNA matrice, amplificirani fragment od interesa mora biti između 50 i 35 000 pb.
- PCR mješavina
 - Početnice (engl. primers) su in vitro sintetizirani jednolančani oligonukleotidi dužine 20-30 nukleotida čije su sekvence komplementarne krajevima DNA fragmenata od interesa. Za umnažanje jednog DNA fragmenta potrebne su dvije početnice. F (engl. forward) početnica komplementarna 5' kraju DNA fragmenta i R (engl. reverse) početnica komplementarna 3' kraju.
Početnice čija je sekvenca specifična za točno određeni fragment DNA uvjetovat će umnažanje isključivo dotičnog fragmenta DNA matrice. Postoje i Multiplex PCR protokoli kojima se u jednoj PCR reakciji, korištenjem adekvatnog broja početnica, umnaža veći broj fragmenata DNA matrice.
 - dNTP (engl. deoxynucleoside triphosphates) je smjesa deoksinukleozid trifosfata (dATP, dTTP, dCTP i dGTP) osnovnih građevnih jedinica DNA. Njihovom se polimerizacijom sintetiziraju amplikoni, tj. umnaža fragment DNA od interesa.
 - DNA polimeraza je enzim s funkcijom sinteze odnosno replikacije DNA. U PCRu se uglavnom koristi Taq polimeraza izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus* koja živi u termalnim izvorima te je otporna na visoke temperature i najaktivnija oko 70°C.
 - MgCl₂ zato što su magnezijevi ioni neophodni za aktivnost DNA polimeraze.

- PCR pufer je standardni pufer u kojem se odvija PCR, a po sastavu je blago lužnata vodena otopina soli.

(Sinčić, 2013.)

Osnovni PCR protokol započinje stavljanjem PCR reakcijske mješavine u PCR tubice volumena 1.5 mL koje se zatim poslože u Termocycler aparat. Termocycler aparat izvodi zadani PCR protokol te se PCR reakcija provodi pod kontrolom računala.

- 1) Inicijalizacija (engl. initialization) je korak koji uključuje aktivaciju enzima i denaturaciju DNA matrica, a provodi se na temperaturi 90-98°C.
- 2) Umnažanje ili PCR ciklus (engl. amplification) ponavlja se 28-35 puta i stvori se više od milijun kopija (amplikona) željenog fragmenta DNA.
 - a) Denaturacija (engl. denaturation) DNA na temperaturi 90-98°C.
 - b) Prijanjanje (engl. annealing) je korak u kojem dolazi do hibridizacije DNA i početnica, a temperatura ovisi o vrsti početnica, no uglavnom je između 45 i 65°C.
 - c) Elongacija (engl. elongation) je faza sinteze amplikona, tj. novih DNA lanaca na temperaturi 70-80°C.
- 3) Terminacija (engl. termination) je dovršavanje sinteze nedovršenih amplikona na temperaturi 70-80°C.
- 4) Održavanje (engl. hold) zapravo nije dio PCRa već je dodatni korak koji osigurava stabilnost amplikona na 4-15°C do njihove upotrebe ili pohrane. Amplikoni su u normalnim uvjetima stabilni te se mogu skladištiti mjesecima na +8°C, godinama na -20°C i neodređeno na -80°C ili tekućem dušiku.

(Sinčić, 2013.)



Slika 4. PCR Termocycler

Pri izvođenju PCR-a mora se paziti na sterilnost jer je mogućnost kontaminacije velika, npr. oljuštene stanice kože s ruku laboratorijskog osoblja. Ta nepoželjna DNA će se isto umnožiti što može dovesti do krivih rezultata. Tako da je korištenje lateks rukavica obavezno (Turnpenny, Ellard, 2011.).

U DNA laboratoriju Medicinskog fakulteta u Zagrebu najčešće se koristi AmpFlSTR[®] Identifiler[®] Plus komplet za PCR. To je STR multipleksna proba koje umnožava 15 tetranukleotid ponavljajućih lokusa i amelogenin spolno određujući marker u jednom PCR umnožavanju.

AmpFlSTR[®] Identifiler[®] Plus koristi modificirane PCR uvjete za povećanu osjetljivost, nove formule pufera za bolju izvedbu sa inhibiranim uzorcima i poboljšane uvjete DNA sinteze i purifikacije amplificiranih primera kako bi se dobila čišća pozadina za elektroforezu. (https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_076395.pdf)

Do sada sam pričala samo o umnožavanju DNA fragmenata putem PCR-a no važno je istaknuti da se ovom metodom može umnažati i molekula RNA i to najčešće glasnička RNA (mRNA). No kako molekula RNA nije tema ovog diplomskog rada neću detaljnije o tome.

5. Metode razdvajanja DNA

Rezultat umnožavanja fragmenta DNA u PCR-u je mješavina amplikona koje je potrebno razdvojiti, a ako se radilo o Multiplex PCR-u može se raditi i o više od 20 različitih DNA fragmenata. Dva uobičajena procesa razdvajanja DNA su kapilarna elektroforeza i gel elektroforeza (Butler, 2001.).

Elektroforeza je metoda razdvajanja heterozigotnih alela na temelju veličine alela. Dolazi od grčke riječi *electron* (naboj) i latinske riječi *phore* (nosilac), a znači električni naboj koji nose molekule. U molekuli DNA fosfatne grupe imaju negativan naboj, zbog čega će se molekula DNA u električnom polju udaljavati od negativne elektrode, katode i putovati prema pozitivnoj elektrodi, anodi. Što je veća voltaža električnog polja, molekula DNA će se brže kretati.

Kretanjem iona u električnom polju oslobađa se toplina, koja se mora negdje odvesti jer će inače doći do njene apsorpcije u sustav. Ako se radi o izuzetno velikoj toplini to može uzrokovati i otapanje gela (Butler, 2001.).

5.1. Gel elektroforeza

Ploča za gel elektroforezu sastoji se od matriksa s jažicama i puferske otopine kroz koju molekule DNA putuju tijekom elektroforeze.

Materijali od kojih se gel radi se izmiješaju i uliju u kalup, a na jednu stranu kalupa u tu mješavinu se stavi i češljic, kako bi, nakon što se gel osuši, ostale jažice u koje se zatim pipetom stavljaju uzorci DNA.

U forenzici su u upotrebi dvije vrste gela. Agarozni gel koristi se za razdvajanje većih fragmenata DNA, 600-23000 bp, koji su dobiveni RFLP (engl. restriction fragment length polymorphism) metodom umnožavanja DNA. Poliakrilamidni gel služi za razdvajanje umnoženih fragmenata DNA metodom PCR veličine 100-400 bp (Butler, 2001.).

5.2. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza kao metoda razdvajanja fragmenata DNA prvi put je upotrebljena krajem 1980-ih, a postala je popularna sredinom 1990-ih. Najučinkovitija je metoda razdvajanja i za male i za velike molekule. Razdvajanje kapilarnom elektroforezom izvodi se u dvijema staklenim kapilarama (najčešće SiO_2) u električnom polju 10-100 puta jačem nego u gel elektroforezi, uz odgovarajući pufer i način detekcije. Uređaj za kapilarnu elektroforezu uključuje izvor visoke voltaže (0-30 kV), fused silica (SiO_2) kapilare, dva rezervoara pufera, dvije elektrode i detektor. Uzorak se dodaje u sustav tako da se jedan rezervoar pufera privremeno zamjeni s uzorkom. Računalo mjeri vrijeme od kada su fragmenti DNA stavljeni u kapilaru pa sve do kraja kapilare gdje se nalazi laser koji ih prvo obasja, a zatim refleksiju svjetla zabilježi detekcijski prozor. Kao i u slučaju gel elektroforeze prve će do kraja kapilare stići manje molekule.

Prednost kapilarne elektroforeze je što je veliki dio postupka automatiziran pa se može provoditi više razdvajanja istovremeno, koristi malu količinu uzorka, a u usporedbi s ostalim metodama je i izuzetno brza (5-30 minuta), iz razloga što može koristiti jače električno polje (Xu, 1996.).

5.3. ABI Prism 310 Genetic Analyzer

ABI Prism 310 Genetic Analyzer često je korištena metoda određivanja STR biljega u forenzičkim DNA laboratorijima. To je uređaj s jednom kapilarom i mogućnošću detekcije višebrojnih fluorescence, a radi bez nadzora.

Sastavni dijelovi ABI Prism 310 Genetic Analyzera su kapilara postavljena između pumpe i elektrode za ubrizgavanje, grijana ploča koja zagrijava kapilaru do određene temperature te uzorci smješteni u nosač za uzorke koji se pomiče gore-dolje da bi postavio uzorke u kapilaru. Razdvajanje elektroforezom započinje nakon što su krajevi kapilare postavljeni u ulazni odnosno izlazni pufer i puštena je struja kroz kapilaru. Većina ABI 310 metoda koristi voltažu od 15000 V i kapilaru dužine 47 cm.

Podaci i analiza genotipa se dobivaju prosječno svakih 30 minuta obrade tako što laser detektira fluorescentno označene uzorke DNA kada prođu kroz prozor detekcije. Velika prednost ove metode je što se ne iskoristi sav uzorak DNA tako da se postupak može ponoviti, a i nije potrebno nikakvo predznanje o kapilarnoj elektroforezi da bi se mogla izvoditi ova analiza (Butler, 2001.).



Slika 5. 3100-Avant Genetic Analyzer

6. Zaključak

U Hrvatskoj se izolacija DNA u velikoj mjeri koristi za određivanje identiteta posmrtnih ostataka nakon Domovinskog rata. U svijetu za određivanje identiteta osoba stradalih u masovnim nesrećama, npr. nedavno srušeni zrakoplov u francuskim Alpama. Zahvaljujući napretku znanosti i tehnologije rodbina stradalih može doći do svojih najmilijih te oni mogu biti dostojno pokopani.

S druge strane, ovi postupci se koriste u kriminalistici za otkrivanje počinitelja zločina, koji za sobom ostave neki biološki uzorak te se mogu privesti sudu i odgovarati za počinjena kaznena djela.

Iz tih razloga, ali i mnogih drugih bitno je da se nastavi sa usavršavanjem tehnika izolacije DNA. Da se ubrza proces, da se iz što manjeg uzorka može izolirati kvalitetna DNA te da se smanji cijena uređaja i reagensa kako bi bila financijski dostupna svim DNA laboratorijima.

7. Zahvale

Zahvaljujem se mentoru, prof.dr.sc. Milovanu Kubatu na stručnom vođenju, potpori i ljubaznosti prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se dipl.ing. Marijani Mašić na pomoći pri prikupljanju podataka za ovaj diplomski rad i ljubaznosti koja mi je uvelike olakšala izradu ovoga rada.

Zahvaljujem se i ostalim članovima povjerenstva, prof.dr.sc. Vedrani Petrovečki i doc.dr.sc. Davoru Mayeru na ukazanom povjerenju pri izradi ovog diplomskog rada.

8. Popis literature

BIO RAD InstaGeneTM Matrix Catalog# 732-6030

Burgoyne L, Kijas J, Hallsworth P, Turner J (1994) Proceeding of the Fifth International Symposium on Human Identification. Madison, Wisconsin: Promega Corporation, str. 163

Burgoyne LA (1996) Solid medium and method for DNA storage. US Patent 5,496,562.

Burgoyne LA (1997) Proceeding of the Eight International Symposium on Human Identification. Madison, Wisconsin: Promega Corporation, str. 153

Butler JM (2001) Forensic DNA Typing, Biology & Technology Behind STR Markers. London-San Diego: Academic Press

KURABO (Handbook) QuickGene DNA tissue kit S (DT-S) For extraction of genomic DNA from tissues

Lorente JA, Lorente M, Lorente MJ, Alvarez JC, Entrala C, Lopez-Munoz J, Villanueva E (1998) Progress in Forensic Genetics 7, 114-116

Perkin Elmer Corporation (1998) AmpFISTR Profiler PlusTM PCR Amplification Kit User's Manual. Foster City, CA: Perkin Elmer Corporation

<https://www.qiagen.com/hr/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/dna-cleanup/qiaquick-gel-extraction-kit/#productdetails> 12.2.2015.

Sinčić N (2013) PCR – vježba

https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_076395.pdf 15.2.2015.

Turnpenny PD, Ellard S (2011) Emeryjeve osnove medicinske genetike, 14. izdanje, Zagreb, Medicinska naklada

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) BioTechniques, 10, 506-513

Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation, BioTechniques Vol. 39, No. 1

Xu Y (1996) Tutorial: Capillary Electrophoresis, The Chemical Educator, Vol.1, No. 2

9. Životopis

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime: Mia Knobloch
Datum rođenja: 09. svibnja 1991.
Mjesto rođenja: Zagreb, Hrvatska
Mjesto stanovanja: Strossmayerov trg 6, 10000 Zagreb

ŠKOLOVANJE I IZOBRAZBA

Fakultet: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet (2009.-
Srednja škola: II. gimnazija, Zagreb, Hrvatska (2005.-2009.)
Osnovna glazbena škola: OGŠ Ivan Zajc, Zagreb, Hrvatska (1999.-2005.)
Osnovna škola: OŠ Pavleka Miškine, Zagreb, Hrvatska (1997.-2005.)

IZVANNASTAVNE AKTIVNOSTI PRI MEDICINSKOM FAKULTETU

2015. Studentska razmjena, Hospital de Santa Maria,
Odjel za oftalmologiju, Lisabon, Portugal
2015. Pasivno sudjelovanje na međunarodnom studentskom kongresu
CROSS11
2015. Sudjelovanje na IFMSA 64th March Meeting General Assembly
2nd-8th March 2015 Antalya, Turkey
2014.-2015. Asistent lokalnog dužnosnika za medicinsku edukaciju u studentskoj
udruzi CroMSIC
2014. Sudjelovanje na dvodnevnoj edukaciji iz Prve pomoći, reanimacije i
osnovnog zbrinjavanja ozlijeđene osobe u organizaciji StEPP-a

2014. Studentska razmjena, Sveučilišna bolnica Nancy,
Odjel maksilofacijalne i plastične kirurgije, Nancy, Francuska
2013. Studentska razmjena, Sveučilišna bolnica Bydgoszcz,
Odjel opće kirurgije, Bydgoszcz, Poljska
2013. Pasivno sudjelovanje na međunarodnom studentskom kongresu
CROSS9
2012. Pasivno sudjelovanje na međunarodnom studentskom kongresu
CROSS8
- 2010.- 2015. Aktivni član studentske udruge CroMSIC

RADOVI

1. V. Varlaj-Knobloch, D. Oršanić-Brčić, D. Griparić, D. Marinković, M. Knobloch:
Efficacy and Safety of Recombinant Tissue Plasminogen Activator for
Thrombosis Permanent Catheter for Haemodialysis; IVth Congress of the
Macedonian Society of Nephrology, Dialysis, Transplantation and Artificial
Organs with International Participation, Ohrid, F.Y.R. Macedonia, June 21-24,
2012
2. V. Varlaj-Knobloch, D. Oršanić-Brčić, V. Rumenjak, I. Brajković, M. Knobloch:
N-terminal proBNP and High Sensitivity Cardiac Troponin I Concentrations in
Haemodialysis Patients; IVth Congress of the Macedonian Society of Nephrology,
Dialysis, Transplantation and Artificial Organs with International Participation,
Ohrid, F.Y.R. Macedonia, June 21-24, 2012
3. V. Varlaj-Knobloch, D. Oršanić-Brčić, I. Brajković, D. Marinković, M. Knobloch,
V. Rumenjak, M. Brajković-Bralić: Vrijednosti NT-proBNP i cTnI kod bolesnika
na programu liječenja kroničnom intermitentnom hemodijalizom; 6. hrvatski

kongres nefrologije, dijalize i transplantacije s međunarodnim sudjelovanjem, Split, Hrvatska, 7.-10. listopada 2011.

4. V. Rumenjak, M. Brajković-Bralić, V. Varlaj-Knobloch, D. Oršanić-Brčić, I. Brajković, D. Marinković, M. Knobloch: Vrijednosti NT-proBNP i visoko osjetljivog cTnI kod bolesnika na programu liječenja kroničnom intermitentnom hemodijalizom; Acta Med Croatica, 2011: 65(Supp.3): 36-40

POSEBNA ZNANJA I VJEŠTINE

Strani jezici: C1 engleski – ESOL Examinations, University of Cambridge

C1 njemački – Deutsches Sprachdiplom der Kultusministerkonferenz

Poznavanje programa Microsoft Office

Vozačka dozvola: B kategorija